

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
29. Januar 2004 (29.01.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/009223 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: B01D 67/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006564

(22) Internationales Anmeldedatum:  
21. Juni 2003 (21.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 33 542.7 23. Juli 2002 (23.07.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): SARTORIUS AG [DE/DE]; Weender Landstrasse  
94-108, 37075 Göttingen (DE).

(72) Erfinder; und  
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DEMMER, Wolfgang

[DE/DE]; Obere Lindenbreite 11, 37077 Göttingen (DE).  
NUSSBAUMER, Dietmar [DE/DE]; Im Tale 1, 37079  
Göttingen (DE). HÖRL, Hans-Heinrich [DE/DE]; Schön-  
berger Weg 16, 37120 Bovenden (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES,  
FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP,  
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,  
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

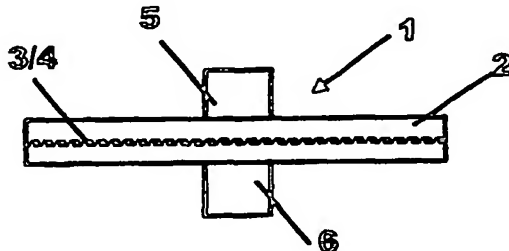
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEMBRANE, FILTRATION MODULE AND METHOD FOR THE SEPARATION OF BIOMOLECULES FROM A  
LIQUID

(54) Bezeichnung: MEMBRAN, FILTRATIONSMODUL UND VERFAHREN ZUR ABTRENNUNG VON BIOMOLEKÜLEN  
AUS EINER FLÜSSIGKEIT



(57) Abstract: The invention relates to a membrane, made from a mi-  
croporous membrane body with an affinity ligand which is capable of  
interacting with at least one type of molecule found in a fluid, whereby  
the membrane body may be stored in a dried condition with retention  
of the activity of the affinity ligand. The invention further relates to a  
filtration module (1) and a method for the separation of biomolecules  
from a liquid, by means of membranes (3) with microporous mem-  
brane bodies to which affinity ligands are coupled, which are capable  
of interacting with the biomolecules for separation, whereby water  
is extensively removed from the membrane body, after coupling of  
the affinity ligand, in a drying process with retention of the activity,  
whereby the membranes may be stored dry as required and subse-

quently the biomolecules are separated off by filtering the fluid through the membranes.

(57) Zusammenfassung: Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, wobei der Membrankörper unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist. Filtrationsmodul (1) und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen (3) mit mikroporösen Membrankörpern (4) an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, wobei dem Membrankörper nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang unter Beibehaltung der Aktivität weitgehend Wasser entzogen wird, wobei bei Bedarf die Membranen trocken zwischengelagert werden, und wobei anschliessend die Flüssigkeit durch die Membranen filtriert und die Biomoleküle abgetrennt werden.



---

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

5

**Membran, Filtrationsmodul und Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit**

Die Erfindung betrifft eine Membran bestehend aus einem  
10 mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Filtrationsmodul zur  
15 Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von  
20 Membranen mit chemisch aktivierten mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind.

25 Gelförmige kugelförmige Träger für Affinitätsliganden werden seit längerem in vielen Bereichen der Biotechnologie zur Reinigung und Abtrennung der verschiedensten Biomoleküle eingesetzt. Ein Beispiel dafür sind die Affinitätsträger auf Agarosebasis welche in Suspension in den Handel kommen.  
30 Das Suspensionsmedium kann dabei Wasser oder ein anderes Lösungsmittel sein. Nur wenige Matrices werden in lyophilisierter Form angeboten.

Weiterhin ist es schwierig bis unmöglich einmal in wässrigem  
35 Medium gequollene Matrices wieder zu trocknen, da die

Gelkügelchen dabei irreversibel geschädigt werden. Die Aufbewahrung und der Transport solcher Gele stellen also ein erhebliches logistisches Problem dar.

- 5 Aus der EP 0 787 523 A1 ist bekannt, zur affinen Stofftrennung an ein Trägermaterial Liganden zu kuppeln, die die Funktion haben, eine einzelne Zielsubstanz oder auch eine ganze Klasse von Substanzen adsorptiv spezifisch zu binden.
- 10 Weiter ist aus der DE 196 17 775 A1 bekannt, Membranadsorber bzw. Membranen zu verwenden, die Liganden tragen, die zur Wechselwirkung mit mindestens einem Stoff einer mit ihm in Kontakt stehenden flüssigen Phase befähigt sind. Der Transport der flüssigen Phase durch die Membran hindurch
- 15 erfolgt dabei konvektiv aufgrund einer Druckdifferenz.

Nachteilig bei der bekannten Abtrennung von Biomolekülen ist, dass die Träger bzw. Membranen mit den angekuppelten Affinitätsliganden aufwendig an einer Austrocknung gehindert werden müssen, um einen Verlust der Bioaktivität der

20 Liganden zu vermeiden. Ein wassernasser Zustand der Membranen birgt zudem die Gefahr eines mikrobiellen Angriffes und bedingt die Notwendigkeit ein Konservierungsmittel zuzusetzen.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Membranen zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Affinitätsliganden bereitzustellen, so dass deren umständliche und kostenintensive nasse Lagerung vermieden

30 werden kann.

Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 1 dadurch gelöst, dass der Membrankörper mit dem Affinitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Af-

35 finitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

Dadurch, dass der Membrankörper praktisch ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken lagerbar ist, können die Lager- und Transportkosten wesentlich verringert werden. Die  
5 Abtrennung der Biomoleküle vereinfacht sich.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass mit Affinitätsliganden, wie Proteinen, beladene Membranen längere Zeit ohne signifikanten Aktivitätsverlust trocken  
10 gelagert werden können. Dabei handelt es sich um mikroporöse Membranen der Fa. Sartorius AG Göttingen, die unter dem Handelsnamen Sartobind<sup>®</sup> erhältlich sind. Unter „trocken“ soll dabei verstanden werden, dass das Porenvolumen der Membran bzw. des Membrankörpers im  
15 wesentlichen durch Luft ausgefüllt ist. Dies schließt nicht aus, dass die innere Oberfläche von einer schwer flüchtigen organischen Substanz bedeckt ist.

Geeignet sind Membranen mit mikroporösen adsorptiven Membrankörpern auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat  
20 (CA), Cellulosenitrat (CN), Polyamid, PESU, PP, PVDF. Die Porengröße beträgt zwischen 0,01 bis 15 µm. Bevorzugt wird eine Porengröße zwischen 0,2 und 5 µm. Der Membrankörper weist weiterhin eine Dicke zwischen 100 und 500 µm, vorzugsweise von 200 bis 300 µm auf.

25 Die Membranen sind vorzugsweise chemisch aktiviert, so dass die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt werden. Es ist aber auch eine physikalische Anbindung der Affinitätsliganden an die Membran möglich.

30 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung weist der Membrankörper eine Imprägnierung mit Glycerin auf. Die Glycerinimprägnierung trägt dazu bei, dass beim Trocknungs-

prozess die Struktur der mikroporösen Membran bzw. des Membrankörpers nicht beschädigt wird.

Mögliche Affinitätsliganden sind dem Fachmann bekannt. Als  
5 Beispiele für adsorptive Liganden werden genannt:

- Thiophile,
- hydrophobe der verschiedenen Kettenlängen und Konfigurationen
- 10 - Reversed Phase,
- reaktive und andere Farbstoffe,
- niedermolekulare ungeladene oder geladene organische Moleküle,
- Aminosäuren und Analoga,
- 15 - Coenzyme, Cofaktoren und deren Analoga,
- Substrate und deren Analoga,
- endokrine und exokrine Substanzen wie Hormone und hormonähnlich wirkende Effektoren und deren Analoga,
- Enzym-Substrate, -Inhibitoren und deren Analoga,
- 20 - Fettsäuren, Fettsäurederivate, konjugierte Fettsäuren und deren Analoga.
- Nukleinsäuren
- DNA, und deren Analoga und Derivate,
- RNA und deren Analoga und Derivate,
- 25 - Monomere und deren Analoga und Derivate,
- Oligo- bis Polymere und deren Analoga und Derivate,
- hochmolekulare Kohlenhydrate linear oder verzweigt; unsubstituiert oder substituiert,
- Glycokonjugate, wie
- 30 - Heparin,
- Amylose, Zellulose,
- Chitin, Chitosan,
- Monomere und Oligomere,
- deren aller Derivate und Analoga,
- 35 - Lignin und dessen Derivate und Analoga.

- Hochmolekulare Liganden wie
  - Proteine und ihre Oligomere, Multimere, Untereinheiten, sowie Teile davon,
  - Peptide, Polypeptide deren Analoga und Derivate,
  - 5 - Lectine,
  - Antikörper und Teile davon,
  - Fusionsproteine,
  - Haptene,
  - Enzyme und Untereinheiten sowie Teile davon,
  - 10 - Strukturproteine,
  - Rezeptoren und Effektoren sowie Teile davon,
  - Xenobiotika
  - Pharmazeutika und Pharmazeutische Wirkstoffe
  - Alkaloide
  - 15 - Antibiotika
  - Biomimetika

Weitere Aufgabe der Erfindung ist es, eine Vorrichtungen bzw. ein Filtrationsmodul anzugeben, dass zur kostengünstigen und effektiven Abtrennung von Biomolekülen geeignet ist.

Diese weitere Aufgabe wird erfindungsgemäß in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 9 dadurch gelöst, dass die Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8 ausgebildet ist.

Durch die Ausbildung der Membrane nach einem der Ansprüche 1 bis 8 weist das Filtrationsmodul die oben genannten Vorteile auf.

Insbesondere kann durch die Verwendung einer Mehrzahl von Membranen eine selektive Trennung verschiedener Biomoleküle erreicht werden. Die Membranen können zudem dem jeweiligen Trennproblem relativ einfach angepasst werden. Die Membra-

nen können mehrlagig in einem Gehäuse angeordnet werden. Sie können aber auch hintereinander in unterschiedlichen Gehäusen oder Gehäusekammern angeordnet werden

- 5 Die bekannten Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen weisen die oben genannten Nachteile auf.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein effizientes und kostengünstiges Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer zu prozessierenden Flüssigkeit anzugeben, das auf eine umständliche nasse Lagerung und Transport verzichten kann.

15 Diese Aufgabe wird in Verbindung mit dem Oberbegriff des Anspruches 12 dadurch gelöst, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

- a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper,
- b) Spülen des Membrankörpers mit mindestens einem Spülmedium,
- 20 c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
- d) trockene Zwischenlagerung der Membranen bei Bedarf und
- e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen, so dass
- 25 die Biomoleküle abgetrennt werden.

Durch die mögliche trockene Lagerung der Membran ohne Aktivitätsverlust wird sowohl die Lagerung als auch der Transport vereinfacht und damit kostengünstiger.

30

Um die Gefahr eines mikrobiellen Angriffs bei Verwendung von Wasser als Spülmedium weitgehend auszuschließen, wird die Membran vorzugsweise auf eine Wasseraktivität von  $\leq 40\%$  getrocknet. Unter Wasseraktivität ist dabei der Gleichge-



wichtspartialdruck des Wassers bezogen auf reines Wasser der gleichen Temperatur zu verstehen.

Dem letzten Spülmedium nach Schritt b) kann noch in einem Schritt b1) eine schwer flüchtige, mit dem Spülmedium  
5 mischbare, organische Substanz bzw. Komponente als Imprägnierungsmittel zugefügt werden. Das Imprägnierungsmittel verbleibt bei dem Trocknungsvorgang in der Membrane. Es kann auf der Porenoberfläche einen Film bilden oder die Membranismatrix in einem gequollenen Zustand erhalten.

10

Weitere Einzelheiten der Erfindung ergeben sich aus der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen, in denen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung beispielhaft veranschaulicht sind.

15

Figur 1: Eine schematische Darstellung eines Filtermoduls mit einer in einem Gehäuse angeordneten Membran,

20 Figur 2: eine schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in Gehäusen hintereinander geschalteten Membran und

Figur 3: eine Schematische Darstellung eines Filtermoduls zum Abtrennen von Biomolekülen mit in einem Gehäuse mehrlagig angeordneten Membranen.  
25

Ein Filtermodul 1 zum Abtrennen von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit besteht im Wesentlichen aus einem Gehäuse 2 und  
30 einer Membran 3 mit einem Membrankörper 4.

Das Gehäuse 2 weist einen Zufluss 5 und einen Abfluss 6 auf. Die Membran 3 mit ihrem mikroporösen adsorptiven Membrankörper 4 ist auf Basis von beispielsweise Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Polyamid, PESU, PP, PVDF ausgebildet  
35

und weist eine Porengröße zwischen 0,01 bis 15 µm, vorzugsweise 0,2 bis 5 µm auf. Der flächig ausgebildete Membrankörper 4 weist dabei eine Dicke zwischen 100 und 500 µm, vorzugsweise 200 bis 300 µm auf. An den Membrankörper 4 sind dem Fachmann bekannte (nicht dargestellte) Affinitätsliganden gekuppelt. Die Affinitätsliganden werden so ausgesucht, dass sie zu einer Wechselwirkung mit dem aus der zu prozessierenden Flüssigkeit abzutrennenden Biomolekül befähigt sind.

10

Die Membran 3 kann entsprechend Fig. 1 einlagig in dem Gehäuse 2 angeordnet sein. Mehrere Gehäuse 2 mit Membranen 3 können dabei hintereinander angeordnet werden.

15 Des ist aber auch möglich, die Membranen 3' mehrlagig in einem Gehäuse 2' anzuordnen. An die Membran 3, 3' wird der nicht dargestellte Affinitätsligand chemisch angekuppelt, die Membran 3, 3' mit Glycerin imprägniert und anschließend einem Trocknungsprozess unterzogen. Dabei wird der Membran 20 3, 3' weitgehend das Wasser entzogen. Nach einer Trockenlagerung bzw. nach einem Transport wird der Membran 3, 3' über den Zufluss 5 die zu prozessierende Flüssigkeit zugeführt und konvektiv durch die Membran transportiert, so dass sie über den Abfluss 6 abfließen kann. Die abzutrennenden Biomoleküle werden dabei an die Affinitätsliganden 25 angebunden.

#### Beispiel:

Die nachfolgend mit PBS bezeichnete Lösung wurde, wie in J. 30 Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis „Molecular Cloning“ A Laboratory Manual, second edition Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, Book 3, Appendix B.12 beschrieben, wie folgt hergestellt:

| g/l              | Substanz   |
|------------------|--|
| 8,0              | Natriumchlorid NaCl                                  |
| 0,20             | Kaliumchlorid KCl                                    |
| 1,44             | di-Natriumhydrogenphosphat $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ |
| 0,24             | Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$    |
| pH 7,4 $\pm$ 0,2 |  |

Eine mit Aldehydgruppen funktionalisierte mikroporöse Membrane des Typs Sartobind® Aldehyde Membrane code 19306 wurde mit Protein A umgesetzt. Dazu wurde Protein A der Fa. Repligen, Bezeichnung rPrA Lot Nr. 011038 zu 10 mg/ml in PBS gelöst. Drei Filterronden mit 25 mm Durchmesser wurden mit 2 ml dieser Lösung in einer kleinen Plastikpetrischale für 3 h bei Umgebungstemperatur geschüttelt. Zur Reduktion der entstandenen Schiffschen Basen wurde 1% Endkonzentration von Cyanoborhydrid zugesetzt. Nach Ablauf der Umsetzung wurden die Membranen entnommen und in eine frische Petrischale überführt. Zur Reduktion der restlichen Aldehydgruppen wurden 5 ml einer Lösung von Natrium-Borhydrid in PBS mit einer Endkonzentration von 1% zugesetzt und die Membranen für weitere 15 min geschüttelt. Die Membranen wurden danach nacheinander mit PBS, einer Lösung von 0.1 M Glyzin pH 2,7, 1 mM HCl, 1 mM NaOH und 1 M NaCl in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 gespült. Die Membranen wurden mit einer Lösung von 22% w/v Glycerol in 0.01 M Kalium-phosphat pH 7.0 imprägniert. Die Membranen wurden dann bei Umgebungstemperatur in einem Luftstrom für 3 h getrocknet und bei 4°C unter weitgehendem Luftabschluss gelagert.

Nach bestimmten Zeiten wurden Membranen entnommen und auf ihre Bindungskapazität für humane Immunglobuline des Typs IgG1 und IgG2 getestet.

Dabei wurden drei der oben beschriebenen Membranen mit 25 mm Durchmesser in ein Spritzenvorsatz Best. Nr. 16517 der

Fa. Sartorius AG eingebaut und mit einer Einwegspritze versehen.

Humanes abgelaufenes Plasma einer örtlichen Blutbank wurde 1:40 mit PBS verdünnt und diese Lösung über 0.2 µm membran-  
5 filtrierte. 10 ml dieser so erhaltenen Lösung wurde in die Spritze gefüllt und durch Schwerkraft über die drei eingebauten Membranen filtrierte. Dann wurde mit 10 ml PBS gespült und die gebundene Menge IgG durch 10 ml 0.1 M Glyzin pH 2.7 eluiert. Die Absorption der Elutionslösung bei 280  
10 nm wurde in einem Spektralphotometer bestimmt und an Hand einer Eichgeraden mit Rinderserumalbumin als Verbleichssubstanz die Proteinbindekapazität der Membrane bestimmt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in der folgenden Tabelle  
15 dargestellt.

Tabelle: Zeitliche Veränderung der IgG Bindekapazität von Protein A beladenen aldehyd-funktionalisierten Membranen

| Zeit (Tage) | Bindekapazität (µg/cm <sup>2</sup> ) |
|-------------|--------------------------------------|
| 0           | 42                                   |
| 1           | 41                                   |
| 4           | 47                                   |
| 20          | 43                                   |
| 45          | 40                                   |
| 56          | 37                                   |

20

Alle Werte sind Mittelwerte aus mindestens 2 Messungen.

## Patentansprüche

5

1. Membran bestehend aus einem mikroporösen Membrankörper mit einem Affinitätsliganden befähigt zur Wechselwirkung mit mindestens einer in einer Flüssigkeit befindlichen Molekülart, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') mit dem Affinitätsliganden unter Beibehaltung der Aktivität des Affinitätsliganden getrocknet lagerbar ist.

10

2. Membran nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') chemisch aktiviert und die Affinitätsliganden chemisch angekuppelt sind.

15

3. Membran nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Affinitätsligand ein bioaktives Molekül ist, dessen Spezifität und / oder Kapazität im getrockneten Zustand des Membrankörpers (4, 4') im Wesentlichen erhalten bleibt.

20

4. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,01 bis 15 µm aufweist.

25

5. Membran nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Porengröße von 0,2 bis 5 µm aufweist.

30

6. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 100 bis 500 µm aufweist.

7. Membran nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Dicke von 200 bis 300 µm aufweist.

5 8. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, dass dem Membrankörper (4, 4') nach Ankupplung des Affinitätsliganden in einem Trocknungsvorgang weitgehend Wasser entzogen wurde.

10 9. Membran nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Membrankörper (4, 4') eine Glycerinimprägung aufweist.

15 10. Filtrationsmodul zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit bestehend aus einem Gehäuse und mindestens einer Membran, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Membran (3, 3', 3'') nach einem der Ansprüche 1 bis 9 ausgebildet ist.

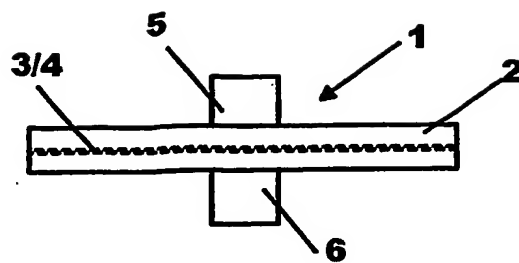
20 11. Filtrationsmodul nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3'') mehrlagig in dem Gehäuse (2'') angeordnet ist.

25 12. Filtrationsmodul nach Anspruch 10 oder 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Mehrzahl von Membranen (3') in Gehäusen (2') hintereinander angeordnet sind.

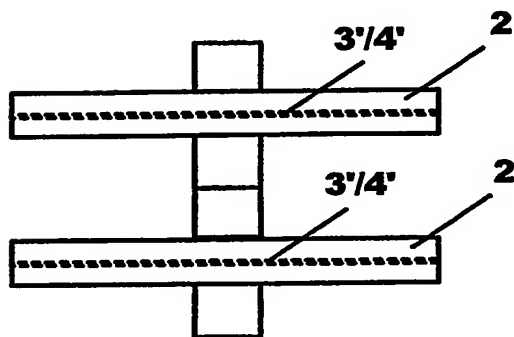
30 13. Verfahren zur Abtrennung von Biomolekülen aus einer Flüssigkeit mit Hilfe von Membranen mit mikroporösen Membrankörpern an die Affinitätsliganden, die zur Wechselwirkung mit den abzutrennenden Biomolekülen befähigt sind, angekuppelt sind, **dadurch gekennzeichnet**, dass folgende Schritte durchgeführt werden:

a) Ankuppeln des Affinitätsliganden in einem Lösungsmittel an den Membrankörper (4, 4'),

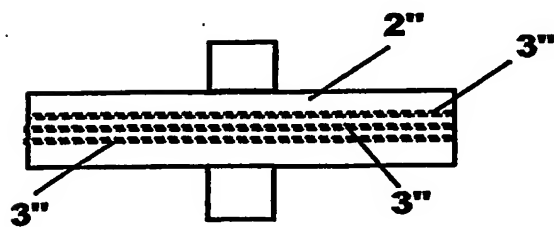
- b) Spülen des Membrankörpers (4, 4') mit mindestens einem Spülmedium,
  - c) weitgehendes Entfernen des letzten Spülmediums durch einen Trocknungsvorgang,
  - 5 d) trockene Zwischenlagerung der Membranen (3, 3', 3'') bei Bedarf und
  - e) Filtrieren der Flüssigkeit durch die Membranen (3, 3', 3''), so dass die Biomoleküle abgetrennt werden.
- 10 14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, dass in Anschluss an Schritt b) der folgende Schritt eingefügt wird:
- b1) Zusetzen einer schwer flüchtigen mit dem Spülmedium mischbaren organischen Komponente in das Spülmedium zum
  - 15 Ende der Spülung nach Schritt b).
15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, dass Glycerin als schwer flüchtige organische Komponente zugesetzt wird.



**Fig. 1**

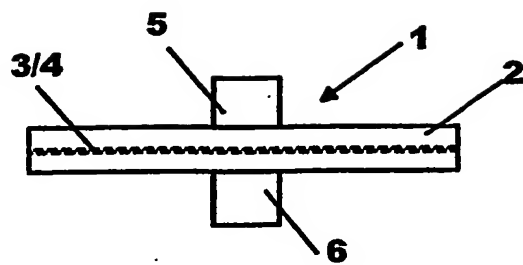


**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 1**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 03/06564

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01D67/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 B01D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | WO 91 03317 A (SARTORIUS GMBH)<br>21 March 1991 (1991-03-21)<br>page 7, line 6-16; example 3<br>---                                       | 1-10,<br>13-15        |
| X          | EP 0 611 592 A (PALL CORP)<br>24 August 1994 (1994-08-24)<br>page 6, line 36-51; examples XIII, XV, -XVII<br>---                          | 1-13                  |
| X          | US 2001/021413 A1 (BRUENING RONALD L ET<br>AL) 13 September 2001 (2001-09-13)<br>paragraphs '0013!-'0019!; examples<br>1,3-7,11,13<br>--- | 1,2,4-9,<br>13        |
| X          | US 5 766 908 A (KLEIN ELIAS ET AL)<br>16 June 1998 (1998-06-16)<br>examples 5,6<br>---  | 1-10,<br>13-15        |
|            | -/--  |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 September 2003

Date of mailing of the international search report

07/10/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Semino, D

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06564

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X        | US 5 286 449 A (KURODA TORU ET AL)<br>15 February 1994 (1994-02-15)<br>column 7, line 51-62<br>column 15, line 26; example 1  | 1-10, 13              |
| A        | YANG L ET AL: "Chitosan-cellulose<br>composite membrane for affinity<br>purification of biopolymers and<br>immunoabsorption", JOURNAL OF MEMBRANE<br>SCIENCE, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL. COMPANY.<br>AMSTERDAM, NL, VOL. 197, NR. 1-2, PAGE(S)<br>185-197 XP004334318<br>ISSN: 0376-7388<br>the whole document | 1-15                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/06564

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date  |
|---|----|---------------------|--|--|
| WO 9103317                                | A  | 21-03-1991          | DE 4028355 A1<br>DE 59009030 D1<br>WO 9103317 A1<br>EP 0490938 A1  | 14-03-1991<br>08-06-1995<br>21-03-1991<br>24-06-1992   |
| EP 0611592                                | A  | 24-08-1994          | GB 2275270 A<br>WO 9417903 A2<br>EP 0611592 A2   | 24-08-1994<br>18-08-1994<br>24-08-1994   |
| US 2001021413                             | A1 | 13-09-2001          | US 5980987 A<br>US 5618433 A<br>US 5547760 A<br>AT 237398 T<br>AU 686796 B2<br>AU 2295295 A<br>BR 9507546 A<br>CA 2188649 A1<br>CN 1151128 A ,B<br>CZ 9603097 A3<br>DE 69530384 D1<br>EP 0757589 A1<br>FI 964305 A<br>HU 75287 A2<br>JP 3100638 B2<br>JP 9511948 T<br>LT 96152 A ,B<br>LV 11791 A<br>NO 964536 A<br>NZ 284360 A<br>PL 317023 A1<br>WO 9529008 A1 | 09-11-1999<br>08-04-1997<br>20-08-1996<br>15-05-2003<br>12-02-1998<br>16-11-1995<br>05-08-1997<br>02-11-1995<br>04-06-1997<br>17-09-1997<br>22-05-2003<br>12-02-1997<br>23-12-1996<br>28-05-1997<br>16-10-2000<br>02-12-1997<br>26-05-1997<br>20-06-1997<br>25-10-1996<br>26-01-1998<br>03-03-1997<br>02-11-1995 |
| US 5766908                                | A  | 16-06-1998          | EP 0880544 A1<br>JP 11503005 T<br>WO 9627614 A1  | 02-12-1998<br>23-03-1999<br>12-09-1996   |
| US 5286449                                | A  | 15-02-1994          | AU 3237489 A<br>CA 1325770 C<br>DE 68910175 D1<br>DE 68910175 T2<br>EP 0341413 A2<br>JP 2029260 A<br>JP 2814399 B2   | 05-10-1989<br>04-01-1994<br>02-12-1993<br>17-02-1994<br>15-11-1989<br>31-01-1990<br>22-10-1998   |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06564

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01D67/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile                                | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X          | WO 91 03317 A (SARTORIUS GMBH)<br>21. März 1991 (1991-03-21)<br>Seite 7, Zeile 6-16; Beispiel 3                                   | 1-10,<br>13-15     |
| X          | EP 0 611 592 A (PALL CORP)<br>24. August 1994 (1994-08-24)<br>Seite 6, Zeile 36-51; Beispiele<br>XIII, XV, -XVII                  | 1-13               |
| X          | US 2001/021413 A1 (BRUENING RONALD L ET<br>AL) 13. September 2001 (2001-09-13)<br>Absätze '0013!-'0019!; Beispiele<br>1,3-7,11,13 | 1,2,4-9,<br>13     |
| X          | US 5 766 908 A (KLEIN ELIAS ET AL)<br>16. Juni 1998 (1998-06-16)<br>Beispiele 5,6   | 1-10,<br>13-15     |

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. September 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

07/10/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Semino, D

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06564

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile   | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X          | US 5 286 449 A (KURODA TORU ET AL)<br>15. Februar 1994 (1994-02-15)<br>Spalte 7, Zeile 51-62<br>Spalte 15, Zeile 26; Beispiel 1<br>-----   | 1-10,13            |
| A          | YANG L ET AL: "Chitosan-cellulose<br>composite membrane for affinity<br>purification of biopolymers and<br>immunoabsorption", JOURNAL OF MEMBRANE<br>SCIENCE, ELSEVIER SCIENTIFIC PUBL. COMPANY.<br>AMSTERDAM, NL, VOL. 197, NR. 1-2, PAGE(S)<br>185-197 XP004334318<br>ISSN: 0376-7388<br>das ganze Dokument<br>----- | 1-15               |

# INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06564

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument |    | Datum der<br>Veröffentlichung |    | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie |  | Datum der<br>Veröffentlichung |
|--|----|-------------------------------|----|-----------------------------------|--|-------------------------------|
| WO 9103317   | A  | 21-03-1991                    | DE | 4028355 A1                        |  | 14-03-1991                    |
|  |    |                               | DE | 59009030 D1                       |  | 08-06-1995                    |
|  |    |                               | WO | 9103317 A1                        |  | 21-03-1991                    |
|  |    |                               | EP | 0490938 A1                        |  | 24-06-1992                    |
| EP 0611592   | A  | 24-08-1994                    | GB | 2275270 A                         |  | 24-08-1994                    |
|  |    |                               | WO | 9417903 A2                        |  | 18-08-1994                    |
|  |    |                               | EP | 0611592 A2                        |  | 24-08-1994                    |
| US 2001021413                                      | A1 | 13-09-2001                    | US | 5980987 A                         |  | 09-11-1999                    |
|  |    |                               | US | 5618433 A                         |  | 08-04-1997                    |
|  |    |                               | US | 5547760 A                         |  | 20-08-1996                    |
|  |    |                               | AT | 237398 T                          |  | 15-05-2003                    |
|  |    |                               | AU | 686796 B2                         |  | 12-02-1998                    |
|  |    |                               | AU | 2295295 A                         |  | 16-11-1995                    |
|  |    |                               | BR | 9507546 A                         |  | 05-08-1997                    |
|  |    |                               | CA | 2188649 A1                        |  | 02-11-1995                    |
|  |    |                               | CN | 1151128 A ,B                      |  | 04-06-1997                    |
|  |    |                               | CZ | 9603097 A3                        |  | 17-09-1997                    |
|  |    |                               | DE | 69530384 D1                       |  | 22-05-2003                    |
|  |    |                               | EP | 0757589 A1                        |  | 12-02-1997                    |
|  |    |                               | FI | 964305 A                          |  | 23-12-1996                    |
|  |    |                               | HU | 75287 A2                          |  | 28-05-1997                    |
|  |    |                               | JP | 3100638 B2                        |  | 16-10-2000                    |
|  |    |                               | JP | 9511948 T                         |  | 02-12-1997                    |
|  |    |                               | LT | 96152 A ,B                        |  | 26-05-1997                    |
|  |    |                               | LV | 11791 A                           |  | 20-06-1997                    |
|  |    |                               | NO | 964536 A                          |  | 25-10-1996                    |
|  |    |                               | NZ | 284360 A                          |  | 26-01-1998                    |
|  |    |                               | PL | 317023 A1                         |  | 03-03-1997                    |
|  |    |                               | WO | 9529008 A1                        |  | 02-11-1995                    |
| US 5766908   | A  | 16-06-1998                    | EP | 0880544 A1                        |  | 02-12-1998                    |
|  |    |                               | JP | 11503005 T                        |  | 23-03-1999                    |
|  |    |                               | WO | 9627614 A1                        |  | 12-09-1996                    |
| US 5286449   | A  | 15-02-1994                    | AU | 3237489 A                         |  | 05-10-1989                    |
|  |    |                               | CA | 1325770 C                         |  | 04-01-1994                    |
|  |    |                               | DE | 68910175 D1                       |  | 02-12-1993                    |
|  |    |                               | DE | 68910175 T2                       |  | 17-02-1994                    |
|  |    |                               | EP | 0341413 A2                        |  | 15-11-1989                    |
|  |    |                               | JP | 2029260 A                         |  | 31-01-1990                    |
|  |    |                               | JP | 2814399 B2                        |  | 22-10-1998                    |